Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg/L.
Direktor: Prof. Dr. med. D. Klaus

Über die Haltbarkeit von Enzymen und Lipiden im Plasma unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Edwin Weber
aus Edenkoben

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck E. Symon · 355 Marburg/Lahn · Friedrichstr. 3

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg/L.
Direktor: Prof. Dr. med. D. Klaus

Über die Haltbarkeit von Enzymen und Lipiden im Plasma unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Edwin Weber
aus Edenkoben

Marburg/Lahn 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 15.2.1972
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik
Correferent: Prof. Dr. med. dent. H. Schnell

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

A. Einleitung und Fragestellung

B. Methodik

1. Probanden
2. Blutentnahme
3. Lagerung
4. Durchgeführte Bestimmungen
5. Blutprobenverarbeitung

a) Glutamat- Pyruvat - Transaminase
b) Glutamat- Oxalacetat - Transaminase
c) Lactat - Dehydrogenase
d) Glutamat - Dehydrogenase
e) Glyceride
α) Triglyceride
ß) Freies Glycerin

C. Ergebnisse

a) Glutamat - Pyruvat - Transaminase
b) Glutamat - Oxalacetat - Transaminase
c) Lactat - Dehydrogenase
d) Glutamat - Dehydrogenase
e) Glyceride
α) Triglyceride
ß) Freies Glycerin

D. Diskussion

E. Zusammenfassung

Abkürzungen

ADP	=	Adenosin - 5 - diphosphat
ATP	=	Adenosin - 5 - triphosphat
GK	=	Glycerokinase
GLDH	=	Glutamat - Dehydrogenase
GOT	=	Glutamat - Oxalacetat - Transaminase
GPT	=	Glutamat - Pyruvat - Transaminase
LDH	=	Lactat - Dehydrogenase
M	=	molar
MDH	=	Malat - Dehydrogenase
N	=	normal
NAD	=	Nicotinamid - adenin - dinucleotid
NADH	=	reduziertes Nicotinamid - adenin -dinucleotid
nm	=	Nanometer
PEP	=	Phosphoenolpyruvat
PK	=	Pyruvat - Kinase
1U	=	die Enzym - Aktivität, die bei 25°C den Umsatz von 1 Mol Substrat in einer Minute bewirkt.

A. Einleitung und Fragestellung.

In den letzten Jahren wurden immer häufiger Enzymaktivitätsbestimmungen im Plasma, Serum oder auch im Zellmaterial als Hilfsmittel zur Diagnosestellung und Verlaufsbeobachtung herangezogen. In engem Zusammenhang mit dem klinischen Bild, der ärztlichen Erfahrung und weiteren Laboruntersuchungen gibt die Kenntnis der Enzymaktivitäten dem Arzt einen bedeutenden Zuwachs an Information.
So lassen sich aus den Enzymbestimmungen wichtige Hinweise auf das Vorliegen einer Erkrankung, Symptome für die ärztliche Differentialdiagnose sowie Einblicke in die Schwere der Zellschädigung gewinnen.
Schon leichte Enzymaktivitätserhöhungen können ein ernst zu nehmendes Symptomeiner beginnenden Krankheit darstellen.
Durch laufende Kontrolle der Enzymaktivitäten im Plasma ist es bei chronischen Erkrankungen möglich, ständig über Ausmaß und Art der Zell- bzw. Organschädigung und über den Erfolg einer Therapie informiert zu sein.
Will man eine Schädigung in einem bestimmten Organ lokalisieren, so ist es ratsam, im Plasma mehrere Enzyme zu messen und zu einem typischen Enzymmuster zusammenzufassen. Der Vergleich mit den Enzymmustern der differentialdiagnostisch in Frage kommenden Organe bringt dann ggf. die Erhärtung der Verdachtsdiagnose. (38, 39, 40, 41, 42). So finden wir die Glutamat- Pyruvat-Transaminase vorwiegend in der Leber vor. Bei Erkrankungen des Leberparenchyms wird sie vermehrt in das Plasma abgegeben. Die GPT ermöglicht mit gewisser Sicherheit die Erkennung einer Hepatitis schon im Frühstadium (wichtig für eine Epidemieprophylaxe) oder bei anikterischem Verlauf sowie die Erfassung von Hepatitis - Virusträgern unter Blutspendern. (8, 33)
Die Glutamat- Oxalacetat- Transaminase liegt sowohl im Cytoplasma als auch in den Mitochondrien vor.

Eine Zunahme der Aktivität der GOT finden wir bei Herz- und Lungeninfarkt, Leberzellschäden, Skelettmuskeltraumen, akuter Pankreatitis, peripheren Gefäßverschlüssen, auch bei Herzinsuffizienz, generalisiertem Ca., postoperativ und bei Bluterkrankungen. (5,9,10,31,32,33,34,38, 45)

Die Gesamt- Lactat- Dehydrogenase ist ein diagnostisch unspezifischer Indikator für die Schädigung fermentreichen Gewebes und spielt in der Glykolyse eine wichtige Rolle. Beim Herzinfarkt, Hämolyse, Metastasenleber, Embolien, Nierenerkrankungen sowie bei malignen Tumoren, insbesondere Hämoblastosen wurde der LDH- Test zu einer wertvollen Hilfe für die Diagnosestellung und Verlaufskontrolle. (11,16, 19, 50)

Der Gehalt an Glutamat- Dehydrogenase ist in der Leber sehr viel höher als in anderen Organen, sodaß man dieses Enzym als leberspezifisch bezeichnen kann. Bemerkenswert ist, daß die GLDH ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist und es somit nur bei Leberzellnekrosen zu einem Anstieg der Enzymaktivität kommt. Ihr Erscheinen im Plasma beweist also tiefgreifende Zellschädigungen. (18, 39,42,45)

Auch die Lipidfraktionen des Blutes gewannen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung.

Die Serumlipidfraktion setzt sich zusammen aus freiem Glycerin, Triglyceriden, freiem Cholesterin, verestertem Cholesterin und verschiedenen Phosphatiden. Das freie Glycerin gilt als brauchbarer Index für das Ausmaß der Lipolyse. (30)

Erhöhte Triglyceridwerte sind als mögliche pathogenetische Faktoren für Herz- und Kreislauferkrankungen anzusehen. Auch arteriosklerotisch verursachte Durchblutungsstörungen lassen häufig eine Triglyceriderhöhung erkennen. Erhöhte Lipide weisen häufig je nach Dauer und Schwere der Erkrankung auf Kohlenhydrat- Toleranzstörungen hin, die häufig zur Bildung eines Diabetes mellitus führen. (1,2,6,7,12,34,35)

Bei Pankreatitis, nephrotischem Syndrom und bei der Glycogenose treffen wir auf eine Lipid-Stoffwechselstörung, vorwiegend eine Hypertriglyceridämie. (3,13,20,21,36,37)

Seit kürzerer Zeit ist es nun möglich, direkte Glycerinbestimmungen mit Hilfe der enzymatischen Analyse vorzunehmen. (15,24,44)
Diese biochemischen Bestimmungen nehmen als moderne Hilfsmittel der Diagnostik einen immer bedeutender werdenden Platz ein, was hauptsächlich an den steigenden Untersuchungszahlen großer Kliniken abzulesen ist.
Dem in der Praxis tätigen Arzt fehlt es allerdings häufig an den erforderlichen Geräten, außerdem mangelt es ihm oft an entsprechend geschultem Personal, das mit exaktester Arbeitsweise, die für derartige Bestimmungen unbedingt gefordert werden muß, vertraut ist.
So bleiben auch heute noch viele klinisch- biochemische Untersuchungen zumeist größeren Laboratorien vorbehalten.
Zu diesem Zweck ist die genaue Kenntnis der Haltbarkeit von Enzymaktivitäten und Lipidfraktionen unter verschiedenen Lagerungszeiten und Temperaturen unerläßlich.
Da auf diesem Gebiet kaum erschöpfende Untersuchungen vorliegen, sollte es Sinn und Zweck dieser Arbeit sein, unter verschiedenen Lagerungszeiten und bei verschiedenen Temperaturen die Stabilität einiger Enzymaktivitäten und Lipidfraktionen im Plasma festzustellen.
Zu diesem Zweck wurden folgende Enzymaktivitäten gemessen: Glutamat - Pyruvat - Transaminase, Glutamat - Oxalacetat - Transaminase. Lactat - Dehydrogenase, Glutamat - Dehydrogenase.
Aus der Reihe der Lipidfraktionen bestimmten wir die Triglyceride und das freie Glycerin.

B. Methodik

1. Probanden

Es wurden 32 Blutproben von 32 Personen verschiedenen Alters und Geschlechts untersucht.
Bei einem kleinen Teil der Probanden handelte es sich um Gesunde, der überwiegende Teil der Untersuchten rekrutierte sich aus Patienten, die wegen verschiedener Erkrankungen die Medizinische Poliklinik zu Marburg/Lahn aufsuchten.

2. Blutentnahme

Die Blutproben wurden am ruhenden Patienten aus den leicht gestauten Armvenen entnommen. Das Blut wurde in heparinisierten Glasröhrchen aufgefangen und sofort 5 Min. lang bei 4×10^3 U/min. zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und auf je 6 mit Gummistopfen oder Parafilm verschlossene Glasröhrchen verteilt.

3. Lagerung

Jede der 32 Proben wurde in 6 Portionen aufgeteilt. Die erste Portion wurde sofort nach der Blutentnahme bestimmt; die zweite wurde 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zwei weitere Proben standen 3 Tage und 7 Tage bei + 4° C im Kühlschrank. Die restlichen 2 Portionen wurden 4 Wochen lang bei - 20°C bzw. bei - 60°C eingefroren.

4. Durchgeführte Bestimmungen

Es wurden jeweils bei den 6 angeführten Portionen der 32 Proben die Glutamat - Pyruvat - Transaminase, die Glutamat - Oxalacetat - Transaminase, die Lactat - Dehydrogenase, die Glutamat - Dehydrogenase, die Triglyceride und das freie Glycerin bestimmt.

Schließlich wurde noch eine kinetische Untersuchungsreihe des freien Glycerins angeschlossen. Hierzu wurden von 10 weiteren gesunden Personen Blutproben gewonnen. Nachdem die Probanden zirka 15 Min. geruht hatten, erfolgte die Blutentnahme auf die oben schon erwähnte Weise. Jede der 10 Proben wurde in 13 Portionen aufgeteilt: die erste Portion wurde sofort verarbeitet, die restlichen Proben wurden mit Parafilm verschlossen, bei Zimmertemperatur gelagert und in folgenden Zeitabständen nach der Entnahme verarbeitet: 1/2 Stunde, 2 Stunden, 5 Stunden, 8 Stunden, 16 Stunden, 24 Stunden, 32 Stunden, 48 Stunden und dann alle 12 Stunden bis 96 Stunden nach der Blutentnahme.

5. Blutprobenverarbeitung

Die Verarbeitung der Blutproben wurde folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wurden die beiden Lipidfraktionen bestimmt, d.h. in diesem Fall die Triglyceride und das freie Glycerin. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Plasmaenzyme GPT, GOT, LDH und GLDH.

a) Glutamat - Pyruvat - Transaminase (GPT)

Zur Bestimmung der Glutamat - Pyruvat - Transaminase bedienten wir uns der von der Fa. Boehringer, Mannheim, eingeführten Biochemica - Test- Kombination - GPT - Kennwort TC-H-II- Best. Nr. 15956 TGAK (UV- Test mit NADH).

Prinzip: (49)

Das Enzym Glutamat - Pyruvat- Transaminase katalysiert die Gleichgewichtsreaktion:

L-Glutamat + Pyruvat $\rightleftharpoons$ L - Alanin + α - Ketoglutarat.

Die Aktivität der Transaminase wird durch Messung der zeitlichen Zunahme des gebildeten Pyruvates über die gekoppelte, durch Lactat - Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion

Pyruvat + NADH + $H^+ \overset{LDH}{\rightleftharpoons}$ L - Lactat + NAD^+ bestimmt.

Meßgröße ist der NADH - Verbrauch, der durch Messung der zeitlichen Abnahme der Extinktion bei 366 nm (334 nm od. 340 nm) bestimmt wird.

Reagentien:

Biochemica - Test - Combination Boehringer " GPT - Test".

Herstellung der Lösungen:

1) Phosphat / Alanin (Ph / Alanin)

0,1 M Phosphatpuffer, pH: 7,4, 0,08 MDL - Alanin.

Die in Fäschchen 1 der Testkombination enthaltene Substanz wird mit bidest. Wasser vollständig gelöst und auf 300 ml verdünnt.

2) Reduziertes Nicotinamid - adenin - dinucleotid (NADH) 0,012 M

Die in Fläschchen 2 befindliche Substanz wird mit 5 ml bidest. Wasser vollständig im Fläschchen gelöst.

3) Lactat - Dehydrogenase (LDH) 0,25 mg / ml

Die in Fläschchen 3 befindliche Lösung wird unverdünnt verwendet.

4) α - Ketoglutarat (KG) 0,25 M

Die in Fläschchen 4 befindliche Substanz wird mit 10 ml bidest.Wasser gelöst.

Durchführung der Bestimmung:

Jeweils unmittelbar vor dem Ansatz werden Ph/Alanin, NADH und LDH in Mengen, die sich nach der Anzahl der durchzuführenden GPT-Bestimmungen richten, vermischt.
Wir führten die Bestimmungen nach einer Modifikation für das Mikrolitersystem, unter Verwendung eines Photometers mit Küvettenwechselautomat und angeschlossenem Schreiber durch.

Die Lösungen 1, 2 und 3 werden wie folgt vorgemischt (Reagentiengemisch):
Für zirka 100 Bestimmungen mischt man 25 ml Lsg. 1 mit 0,5 ml Lsg. 2 und 0,5 ml Lsg. 3. Das Reaktionsgemisch ist nur am Tag der Zubereitung haltbar.
In die 6 Mikroküvetten eines Küvettenhalters, der an einen Durchlaufthermostaten (25°C) angeschlossen ist, gibt man:

0,050 ml Serum
0,200 ml Reagentiengemisch (Lsg. 1 - 3)

Danach mischt man mit Plastikstäbchen und läßt zirka 5 - 10 Min. zur Vorinkubation stehen.
Danach gibt man in jede Küvette:

0,010 ml α - Ketoglutaratlösung (Lsg. 4),

mischt und setzt den Küvettenhalter auf die Wechselautomatik. Die Verstärkung am Photometer wird bei Hg 366 nm und Extinktionsspreizung 0 - 1 an der Transformationsstufe so gewählt, daß ein normal gefärbtes Serum (nicht ikterisch oder lipämisch) etwa Extinktion 0,5 zeigt. Der Papiervorschub beträgt 1 cm/min, die Wechselfrequenz 30".
Mit der Handauslösung wird Küvette Nr. 1 in den Strahlengang gebracht und der Meßvorgang durch Einschalten des Papiervorschubes in Gang gesetzt. Nach 2 - 3 Durchläufen (6 - 9 Minuten) wird dann der Küvettenhalter gegen einen neugefüllten ausgetauscht. Die Auswertung erfolgt entweder über die Gradskala des Enzymtestauswerters und die entsprechende Umrechnungstabelle oder direkt über die in mE/ml geeichte Skala.

Berechnung:

Hg 366 nm : $tg \alpha$ x 79 = mU/ml

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite bei 12 Parallelbestimmungen ergab bei einem Mittelwert von 7,166 mU/ml eine Standardabweichung von $\pm$ 0,577 mU/ml.

Kritik:

a) Die Genauigkeit der photometrischen Analyse ist von mehreren Faktoren abhängig. Der Gesamtfehler setzt sich aus mehreren möglichen Einzelfehlern zusammen:
   1) dem methodischen Fehler (Einfluß veränderter Reagenzmengen, abweichender pH - Werte, usw.),
   2) dem Volumenfehler (Meßkolbenfehler beim Auffüllen der zu photometrierenden Lösung, Pipettenfehler beim Entnehmen von aliquoten Teilen, auch Temperaturfehler, die sich auf das Volumen auswirken);
   3) dem eigentlichen Temperaturfehler (Einfluß der Temperatur auf die Extinktion);
   4) dem Küvettenfehler (Schichtdickenfehler);
   5) dem eigentlichen Meßfehler des Photometer.

   Der letztere ist bei einem hochwertigen Photometer im Verhältnis zum Gesamtfehler fast so gering wie der Wägefehler im Verhältnis zum Gesamtfehler bei einer gravimetrischen Analyse. Bei hochwertigen Geräten sind die Meßfehler im allgemeinen so klein, daß sie vernachlässigt werden können. Der resultierende Gesamtfehler wird unter dieser Voraussetzung weitgehend von der Beherrschung der Fehlergruppen 1 - 4 abhängen.

b) Sind die errechneten Werte höher als 80 mU/ml, so wird der Ansatz mit einer im Verhältnis 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Serumprobe wiederholt.

c) Zeigt ein Serum überhaupt keine Aktivität, so ist zu vermuten, daß bereits vor Beginn der Messung alles NADH verbraucht wurde (sehr hohe Aktivität). Auch in diesem Falle muß eine erneute Messung einer im Verhältnis 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Serumprobe wiederholt werden.

d) Hämolytische Seren ergeben nicht verwendbare Meßergebnisse.

b) Glutamat - Oxalacetat - Transaminase (GOT)

Bei der Durchführung der Bestimmungen der Glutamat - Oxalacetat- Transaminase bedienten wir uns wiederum der von der Fa. Boehringer, Mannheim, eingeführten Biochemica - Test - Combination - GOT - Kennwort TC - A - II, Best. Nr. 15955 TGAF (UV- Test mit NADH).

Prinzip: (22)

Das Enzym - Glutamat - Oxalacetat - Transaminase katalysiert die Gleichgewichtsreaktion:

L - Glutamat + Oxalacetat $\rightleftharpoons$ L - Aspartat + α - Ketoglutarat.

Man bestimmt die Aktivität der GOT aus der Geschwindigkeit, der durch diese Reaktion hervorgerufenen Oxalacetat - Zunahme. Diese wird in der gekoppelten, durch Malat - Dehydrogenase katalysierten, Indikatorreaktion bestimmt.

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + H^+ \xrightleftharpoons{\text{MDH}} \text{L - Malat} + NAD^+$$

Auch hier ist der NADH - Verbrauch Meßgröße. Dieser wird durch Messung der zeitlichen Abnahme der Extinktion bei 366 mm bestimmt.

Reagentien:

Biochemica- Test- Combination Boehringer " GOT - Test".

Herstellung der Lösung:

1) Phosphat / Aspartat (Ph / Aspart.)

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, 0,04 M L- Aspartat

Die in Fläschchen 1 der Testkombination befindliche Substanz wird mit bidest. Wasser vollständig gelöst und auf 300 ml verdünnt.

2) Reduziertes Nicotinamid - adenin - dinucleotid. (NADH)

0,012 M

Die in Fläschchen 2 befindliche Substanz wird mit 5 ml bidest. Wasser vollständig gelöst.

3) Malatdehydrogenase (MDH) 0,25 mg MDH/ml, 0,25 mg LDH/ml

Die in Fläschchen 3 befindliche Substanz wird unverdünnt verwendet.

4) α - Ketoglutarat (KG) 0,25 M

Die in Fläschchen 4 der Testkombination befindliche Substanz wird mit 10 ml bidest. Wasser gelöst.

Durchführung der Bestimmung:

Jeweils unmittelbar vor dem Ansatz werden Ph/ Aspartat., NADH und MDH in Mengen, die sich nach der Anzahl der durchzuführenden GOT-Bestimmungen richtet, vermischt.
Auch hier führten wir die Bestimmungen nach einer Modifikation für das Mikrolitersystem, unter Verwendung eines Photometers mit Küvettenwechselautomat und angeschlossenem Schreiber durch.
Die Lösungen 1, 2 und 3 werden wie folgt vorgemischt (Reagentiengemisch).Dieses Gemisch ist nur am Tag der Zubereitung verwendbar.
Für zirka 100 Bestimmungen mischt man 25 ml Lösung 1 mit 0,5 ml Lsg. 2 und 0,5 ml Lsg. 3.
In die 6 Mikroküvetten eines Küvettenhalters, der an einen Durchlaufthermostaten (25°C) angeschlossen ist, gibt man:

0,050 ml Serum

0,200 ml Reagentiengemisch (Lsg. 1 - 3)

Danach mischt man mit Plastikstäbchen und läßt zirka 5 - 10 Min. zur Vorinkubation stehen. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit gibt man in jede Küvette

0,010 ml α - Ketoglutarat -Lösung (Lsg.4)

mischt gut durch und setzt den Küvettenhalter auf die Wechselautomatik.

Auch hier wird die Verstärkung am Photometer bei Hg 366 nm und Extinktionsspreizung 0 - 1 an der Transformationsstufe so gewählt, daß ein normal gefärbtes Serum etwa Extinktion 0,5 zeigt. Der Papiervorschub beträgt 1 cm/Min., die Wechselfrequenz 30 ". Nach 2 - 3 Durchläufen wird der Küvettenhalter gegen einen neugefüllten ausgetauscht.
Die Auswertung erfolgt auch hier entweder über die Gradskala des Enzymtestauswerters und die entsprechende Umrechnungstabelle oder direkt über die in mU/ml geeichte Skala.

Berechnung:

Hg 366 nm: tg α x 79 = mU/ml

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite bei 12 Parallelbestimmungen ergab bei einem Mittelwert von 10,250 mU/ml eine Standardabweichung von $\pm$ 0,398 mU/ml.
Bei pathologischen Seren mit Transaminase- Werten weit über der Norm ergab die Fehlerbreite bei 12 Parallelbestimmungen einen Mittelwert von 67,583 mU/ml und eine Standardabweichung von $\pm$ 6,473 mU/ml.

Kritik:

Auch bei der Bestimmung der Aktivität der Glutamat - Oxalacetat - Transaminase ist die Genauigkeit der photometrischen Analyse von den oben angeführten Faktoren abhängig.

b) Bei pathologischen Seren, die höhere Werte als 80 mU/ml ergeben, wird der Ansatz mit einer im Verhältnis 1:10 mit physiol. Kochsalzlösung verdünnten Serumprobe wiederholt.
c) Zeigt ein Serum keinerlei Aktivität, so wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits vor der Messung alles NADH verbraucht (sehr hohe Aktivität). Die Messung ist mit entsprechend hoher Verdünnung erneut vorzunehmen.
d) Hämolytische Seren liefern keine verwertbaren Meßergebnisse.

c) Lactat - Dehydrogenase.

Die Bestimmung der Lactat - Dehydrogenase erfolgte mit Hilfe der Biochemica - Test- Combination - LDH der Fs. Boehringer. Kennwort TC - G - 1, Best. Nr. 15977 TLAB (UV - Test mit NADH).

Prinzip: (50)

Das Enzym Lactat - Dehydrogenase katalysiert die wasserstoffübertragende Reaktion

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

deren Gleichgewicht weit auf der Seite von Lactat und NAD^+ liegt. Man bestimmt die Aktivität der LDH aus der Geschwindigkeit, der durch diese Reaktion hervorgerufenen NADH - Abnahme. NADH ist Meßgröße und auf Grund seiner Absorption bei 366 nm leicht zu bestimmen.
Die im folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von F. Wroblewski und F.S. La Due an und wurde von uns leicht modifiziert durchgeführt.

Reagentien:

Biochemica - Test- Combination "LDH"

Herstellung der Lösungen:

1) Puffer / Pyruvat (0,05 m Phosphatpuffer, pH = 7,5; 0,00031 M Pyruvat)

Inhalt der Flasche 1 mit 110 ml bidest. Wasser lösen.

2) NADH (0,009 M NADH):

Durchführung der Bestimmung:

Vor dem Ansatz werden pH/ Pyruvat und NADH wie folgt gemischt:
Für zirka 50 Bestimmungen löst man den Inhalt einer Flasche 2 (NADH) mit 35 ml der Lsg. aus Flasche 1.
Die so hergestellte Reagentienlösung ist nur am Tag der Zubereitung verwendbar.
Die Bestimmungen wurden auch hier unter Verwendung eines Photometers mit Küvettenwechselautomat und angeschlossenem Schreiber durchgeführt.
In 6 MT - 4 Küvetten wurden je
0,020 ml Serum vorgelegt und dazu
0,600 ml der Reagentienlösung gegeben.
Mit Plastikstäbchen gut mischen und sofort den Meßvorgang beginnen. Die Messung erfolgt bei Wellenlänge 366 nm und bei einer Temperatur von 25°C. Der Papiervorschub beträgt 2 cm/min., die Registrierlänge 0,5 cm, d.h. Küvettenwechsel findet alle 15 Sek. statt. Nach 2 - 3 Durchläufen (3 - 5 Min.) wird der Küvettenhalter gegen einen neu gefüllten ausgetauscht.
Die Ausrechnung erfolgt auch hier über die Gradskala des Enzymtestauswerters und die entsprechende Umrechnungstabelle.

Berechnung:

Hg 366 nm : tg α x 940 = mU/ml

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite bei 12 Parallelbestimmungen ergab bei einem Mittelwert von 123,08 mU/ml eine Standardabweichung von $\pm$ 5,16 mU/ml.

Kritik:

a) Die Gesamt - LDH - Aktivität setzt sich aus verschiedenen LDH - Isoenzym - Aktivitäten zusammen. So findet sich bei der Schädigung eines bestimmten Organs eine typische Isoenzym - Kombination auch im Plasma wieder. Durch die Differenzierung der LDH - Isoenzyme wurden die diagnostischen Möglichkeiten der LDH - Bestimmung beträchtlich erweitert. Wir haben bei unseren Messungen nur die Gesamtaktivität der Lactat - Dehydrogenase bestimmt.

b) Der bei der Bestimmung auftretende mögliche Gesamtfehler setzt sich aus den gleichen Fehlergruppen zusammen, die bereits bei der Beschreibung der Bestimmungen der Transaminasen Erwähnung fanden.

c) Werden bei pathologischen Seren höhere Aktivitäten als 250 mU/ml vorgefunden, so wird der Testansatz mit entsprechender physiol.Kochsalzverdünnung wiederholt.

d) Bei der Aktivitätsbestimmung in hochaktiven Seren kann in der Zeit zwischen Zugabe von Serum und 1. Messung bereits ein großer Teil der NADH- Menge verbraucht sein. Die Reaktion verläuft dann nicht mehr unter optimalen Bedingungen, es wird eine zu geringe oder gar keine Aktivität gefunden. In solchen Fällen ist dann eine entsprechende Verdünnung angezeigt.

e) Bei hämolytischen Seren sind die Meßergebnisse nicht zu verwerten. Bedingt durch den hohen LDH- Gehalt der Erythrocyten werden schon bei geringer Hämolyse zu hohe Werte der LDH im Serum gefunden.

d) Glutamat - Dehydrogenase

In der Biochemica - Test- Combination "GLDH" der Fa. Boehringer, Kennwort TC - Y, Best. Nr. 15995 TGAD liegen uns die Reagentien vor, mit deren Hilfe wir die Aktivität der Glutamat - Dehydrogenase bestimmen(UV-Test mit NADH).

Prinzip: (42)

Das Enzym Glutamat - Dehydrogenase katalysiert die wasserstoffübertragende Reaktion:

α - Ketoglutarat + NADH + NH^+_4 $\rightleftharpoons$ Glutamat + NAD^+ + H_2O,

deren Gleichgewicht weit auf der Seite von Glutamat und NAD liegt. Man bestimmt die Aktivität der GLDH aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen NADH - Abnahme. NADH ist Meßgröße und auf Grund seiner Absorption bei 366 nm leicht zu bestimmen.

Die im folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von E. Schmidt an (42).
Bei der Bestimmung der Aktivität der GLDH bedienten wir uns einer Modifikation für das Mikrolitersystem.

Reagentien:

Biochemica- Test - Combination " GLDH"

Herstellung der Lösungen:

1) Puffer (0,5 M Triäthanolaminpuffer , pH = 8,0;
0,004 M Äthylendiamintetraacetat):
Inhalt der Flasche 1 mit 30 ml bidest. Wasser lösen.

2) Ammoniumacetat (3,2 M Ammoniumacetat):
Lösung der Flasche 2 unverdünnt verwenden.

3) NADH (0,012 M NADH)
Inhalt der Flasche 3 mit 1,0 ml bidest. Wasser lösen.

4) α-Ketoglutarat (0,41 M α - Ketoglutarat):
Inhalt der Flasche 4 mit 1,0 ml bidest. Wasser lösen.

Durchführung der Bestimmung:

Für zirka 10 Bestimmungen mischt man
2,00 ml Lsg. 1
0,10 ml Lsg. 2
0,05 ml Lsg. 3

Dieses Gemisch muß unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden. Die Messungen werden wiederum unter Benutzung eines Photometers mit Küvettenwechselautomat und angeschlossenem Schreiber durchgeführt.

In 6 Reaktionsgefäße pipettiert man

0,100 ml Serum und

0,200 ml Reagentiengemisch

Mit Plastikstäbchen mischen und zirka 15 - 20 Min. zur Vorinkubation stehen lassen. Danach gibt man in jedes Reaktionsgefäß 0,005 ml α - Ketoglutarat - Lsg. (Lsg. 4), mischt und füllt je einen Testansatz in eine entsprechende Mikroküvette. Durch Einschalten des Papiervorschubes, der 1 cm /min. beträgt, wird der Meßvorgang bei Hg 366 nm begonnen. Nach 3 Durchläufen kann die Auswertung über die Gradskala des Enzymtestauswerters erfolgen.

Berechnung:

Hg 366 nm : tg α x 46,2 = mU/ml

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite bei 12 Parallelbestimmungen ergab bei einem Mittelwert von 2,066 mU/ml eine Standardabweichung von $\pm$ 0,230 mU/ml.

Kritik:

a) Auch bei der Bestimmung der Aktivität der Glutamat - Dehydrogenase sind die oben schon beschriebenen möglichen Fehlerquellen in Betracht zu ziehen.
b) Bei pathologischen Seren, deren Aktivität über 30 mU/ml liegt, wird der Testansatz mit entsprechender Verdünnung wiederholt.
c) Hämolytische Seren verfälschen die Meßergebnisse.

e) Glyceride

∝) Triglyceride

Glyceridbestimmungen wurden nach der von Eggstein und Kreutz entwickelten enzymatischen Methode vorgenommen (14, 15, 24).

Prinzip:

Neutralfette werden durch alkoholische KOH verseift. Das durch die Verseifung frei gewordene Glycerin wird mit Hilfe von Glycerokinase enzymatisch bestimmt. Die Reaktionen und Hilfsreaktionen verlaufen folgendermaßen:

1) Glycerin + ATP $\xrightarrow{GK}$ Glycerin - 1 - Phosphat + ADP

2) ADP + PEP $\xrightarrow{PK}$ ATP + Pyruvat

3) Pyruvat + NADH + H^+ $\xrightarrow{LDH}$ Lactat + NAD^+

Glycerin wird also zunächst mit Glycerokinase und ATP zu Alpha - Glycerophosphat und ADP umgewandelt. Das entstandene ADP wird mittels der durch Pyruvatkinase katalysierten Hilfsreaktion mit Phosphoenolpyruvat unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP übergeführt. Pyruvat wird durch NADH mit Hilfe von LDH zu Lactat hydriert, NADH zu NAD^+ oxydiert. Die Umwandlung von Glycerin zu Alpha - Glycerophosphat geht mit der Oxydation äquimolekularer Mengen NADH einher, die verbrauchte NADH - Menge ist also der Glycerinmenge äquivalent.

Reangentien:

Für die Verseifung:

0,5 n äthanolische Kalilauge : (3,30 g 85%ig. Kaliumhydroxyd p.a. glycerinfrei,)in 10 ml bidest. Wasser lösen. Nach Abkühlung auf 100 ml mit unvergälltem, absoluten Alkohol auffüllen.

Magnesiumsulfat- Lösung 0,15 m, (z.B. Best. Nr.. 15907 TYAQ bei Fa. Boehringer) oder

3,7 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, p.a. in 100 ml dest. Wasser lösen.
Die Konzentration der äthanolischen Kalilauge muß durch Titration mit entsprechenden Maßlösungen überprüft und ggf. genau eingestellt werden.
Zur Durchführung des enzymatischen Glycerin- Tests bedienten wir uns der Biochemica - Test - Combination Glycerin und Neutralfett der Fa. Boehringer, Kennwort : TC-GL, Best. Nr. 15989 TNAA (UV - Test mit NADH).

Arbeitslösung I (0,1 M Triäthanolaminpuffer, ph 7,6;
0,004 M Magnesiumsulfat)
Arbeitslösung II NADH/ATP/ PEP (0,006 M NADH, 0,033 M ATP,
0,011 M PEP)
Arbeitslösung III LDH/ PK (2 mg LDH / ml, 1 mg PK/ ml
Arbeitslösung IV GK (2 mg/ml)

Durchführung der Bestimmung:

Zur Verseifung pipettiert man 0,2 ml Serum und 0,5 ml äthanolische Kalilauge in ein Zentrifugenglas, verschließt mit sauberem Stopfen oder Parafilm und läßt 30 Min. bei 70°C im Wasserbad stehen. Dann wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend 1 ml Magnesiumsulfat- Lösung zugeben, gut mischen, zentrifugieren und 0,5 ml der klaren Lösung zum Test einbringen.
Man pipettiert nun
2,50 ml Arbeitslösung I
0,10 ml Arbeitslösung II
0,50 ml Überstand
0,02 ml Suspension III
in eine Küvette, mischt mit Plastikspatel und läßt 10 Min. bei Raumtemperatur stehen und mißt die Extinktion E_1 bei 366 nm. Die Reaktion kommt zum Stillstand. Nun werden 0,02 ml GK (Suspension 4) zugesetzt und nach 10 und 15 Minuten abgelesen. Kommt die Reaktion noch nicht zum Stillstand, werden 3 - 5 weitere Ablesungen im Abstand von 2 Min. durchgeführt und E_2 auf die Zeit der Zugabe von GK extrapoliert.

$$E = E_1 - E_2$$

Die photometrische Messung der Proben erfolgt gegen Luft bei einer Wellenlänge von 366 nm.

Berechnung:

Bei der Berechnung des Gesamtglycerins ist die durch Verseifung und Neutralisation eingetretene Verdünnung zu berücksichtigen. Der Verdünnungsfaktor beträgt 8,5. Daraus ergibt sich für die Berechnung des Gesamtglycerins im Serum

Δ E 366 nm x 149,0 = mg/100 ml Gesamtglycerin im Serum

mg/100 ml Gesamtglycerin - mg/100 ml freies Glycerin = mg/100 ml Glycerid - Glycerin

mg/100 ml Glycerid- Glycerin x 9,62 = mg / 100 ml Neutralfett (Triglyceride).

Der Faktor 9,62 wird durch Division des mittleren Molgewichtes der Serum- Neutralfette (885) durch das Molgewicht des Glycerins (92) erhalten.

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite bei 12 Parallelbestimmungen ergab bei einem Mittelwert von 194,85 mg/100 ml eine Standardabweichung von $\pm$ 6,845 mg/100 ml.

Kritik:

a) Es empfiehlt sich, bei jeder Messung einmal den Leerwert zu ermitteln. Dazu wird die Bestimmung mit Wasser statt mit Serum durchgeführt. Die hierbei nach Zugabe von Suspension 4 eventuell auftretende Extinktionsdifferenz ist jeweils von der mit der Probe erhaltenen Extinktionsdifferenz abzuziehen.

b) Durch zu lange und unsachgemäße Lagerung der Lösung 2 kann sich ATP zersetzen. Dies führt zu einem zusätzlichen NADH - Verbrauch, so daß für die eigentliche Glycerinbestimmung nicht mehr genügend NADH vorhanden ist, die Reaktion dadurch vorzeitig zum Stillstand kommt und eine zu niedrige Glycerinkonzentration erhalten wird. Man überzeuge sich daher nach beendeter Reaktion durch Zugabe von 0,02 ml einer verdünnten Glycerinlösung, ob erneut Extinktionsabfall eintritt.

c) Die spezifische Reaktion auf Glyceride macht keine Fettextraktion, keine Abtrennung der Phosphatide und anderer Substanzen für den Triglyceridnachweis erforderlich. Die Triglyceride müssen lediglich quantitativ so hydrolisiert werden, daß unverändertes Glycerin als Hydrolyseprodukt anfällt.
Das läßt sich mit einem 5 - fachen Überschuß an 0,5 N äthanol. KOH bei 70°C über 15 - 20 Minuten erreichen. Kritisch sind Alkalität, Hydrolysezeiten und Temperatur, auch das Lösungsmittel. In methanolischer Kalilauge entstehen Reaktionsprodukte, welche enzymatisch nicht mehr nachweisbar sind. Im wässrigen Milieu ist die Verseifung nicht quantitativ. Es resultieren zu niedrige Gesamt-, damit zu niedrige Glycerid - Glycerinwerte. Neben Triglyceriden verseifen unter den gewählten Bedingungen auch Cholerinester und Glycerophosphate. Aus diesen entsteht kein Glycerin sondern alkalistabiles - Glycerophosphat, welches teilweise in ß-Glycerophosphat umgelagert wird. Beide Verbindungen reagieren bei der enzymatischen Glycerinbestimmung nicht mit. Glycerophosphatide stören also die Triglycerin- bzw. Glycerid - Glycerin - Berechnung nicht.

ß) Freies Glycerin

Einer Neutralfettbestimmung soll immer eine Bestimmung des freien Glycerins vorausgehen. Zur Durchführung unserer Tests bedienten wir uns auch hier der von der Fa. Boehringer entwickelten Biochemica - Test - Combination "Glycerin und Neutralfett", Kennwort TC - GL, Best. Nr. 15989 TNAA (UV- Test mit NADH).

Prinzip: (44)

Die bei der Bestimmung des freien Glycerins ablaufenden Reaktionen und Nebenreaktionen sind die gleichen, die oben bei der Berschreibung der Glycerid - Bestimmung Erwähnung fanden.

Die Vorbehandlung des Plasmas, das letztlich in den Test eingebracht wird, unterscheidet sich allerdings von der oben angegebenen Methode.

Reagentien:

Für die Enteiweißung und Neutralisation:

0,60 n Perchlorsäure (Fa. Boehringer, Best. Nr. 15902 TYAG) Phenolphthalein
0,5 n äthanolische Kalilauge (Fa. Boehringer, Best. Nr. 15916 TYBD)

Für die enzymatische Bestimmung des freien Glycerins:

Arbeitslösung I (Puffer)
Arbeitslösung II (NADH / ATP / PEP)
Arbeitslösung III (LDH / PK)
Arbeitslösung IV (GK)
siehe Triglyceride.

Durchführung der Bestimmung:

Zum Enteiweißen pipettiert man 1 ml des zu untersuchenden Plasmas und 1 ml 0,6 n Perchlorsäure in ein Zentrifugenglas und zentrifugiert. Der Überstand wird in ein sauberes Glas abgegossen und aus diesem Überstand 1 ml in ein Zentrifugenglas pipettiert. Jetzt fügt man 0,01 ml Phenolphthalein als Indikator hinzu, titriert mit 0,5 n KOH (glycerinfrei) und zentrifugiert erneut.
Kaliumperchlorat fällt aus, der Überstand wird abgegossen und von dieser Lösung 0,5 ml in den Test eingebracht. Man pipettiert nun:
2,50 ml Arbeitslösung I
0,10 ml Arbeitslösung II
0,50 ml Überstand
0,02 ml Suspension III
in eine Küvette, mischt und läßt 10 Min. bei Raumtemperatur stehen.

Anschließend mißt man die Extinktion E_1 bei 366 nm. Ist die Reaktion zum Stillstand gekommen, werden 0,02 ml GK (Suspension 4) zugesetzt und nach 10 und 15 Minuten abgelesen.

Δ E = $E_1 - E_2$

Δ E - Leerwert = Δ E korr.

Die photometrische Messung der Proben erfolgt gegen Luft bei einer Wellenlänge von 366 nm und einer Schichtdicke der Küvetten von 1 cm.

Berechnung:

Bei der Berechnung des freien Glycerins ist die durch Enteiweißung und Neutralisation entstandene Verdünnung zu beachten, so daß sich folgender Faktor ergibt:

$$f = \frac{92{,}1 \times 3{,}14 \times (1\text{ml Überstand} + 0{,}01\text{ ml Phenolphthalein+Verbr.KOH}) \times}{3{,}3 \times 0{,}5 \times 1000}$$

f x Δ E korr. = mg /100 ml freies Glycerin

92,1 = Molgewicht des Glycerins

3,14 = Küvetten - Volumen

3,3 cm^2 / Mol = Extinktionskoeffizient von NADH bei 366 nm.

(0,5 ml = Menge des in den Test eingebrachten Überstandes.)

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite bei 12 Parallelbestimmungen ergab bei einem Mittelwert von 0,692 mg/100 ml eine Standardabweichung von $\pm$ 0,067 mg / 100 ml.

Kritik:

a) Bei jeder Messung (Testpackung) sollte einmal der Leerwert ermittelt werden. Eine auftretende Extinktionsdifferenz muß jeweils von der mit der Probe erhaltenen Extinktionsdifferenz abgezogen werden.

b) Da durch die Titration die oben schon beschriebenen möglichen Fehlerquellen (Methodische Fehler, Volumenfehler, Temperaturfehler, Küvettenfehler, Meßfehler des Photometers usw.) leicht vermehrt werden können, muß auf exakteste Durchführung der Bestimmung allergrößter Wert gelegt werden.

C. Ergebnisse

1. Glutamat - Pyruvat- Transaminase.

In Tabelle I sind die Mittelwerte sowie die Streuung der Einzelwerte der Glutamat - Pyruvat - Transaminase in mU/ml für die Sofortbestimmung nach 3- tägigem Stehen bei Zimmertemperatur, bei 3 und 7- tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank sowie nach 4- wöchigem Einfrieren bei-20°C und bei - 60°C zusammengafaßt.
Tabelle I zeigt einen Ausgängsmittelwert von 9,89 mU/ml; im Vergleich hierzu zeigt sich:
nach 3-täg. Stehen bei Zimmertemperatur ein Mittelwert von 10,13 mU/ml, nach 3-täg.Stehen im Kühlschrank ein Mittelwert von 11,59 mU/ml, nach 7-täg. Stehen im Kühlschrank ein Mittelwert von 11,38 mU/ml, nach 4 Wochen bei - 20°C ein Mittelwert von 9,06 mU/ml, nach 4 Wochen bei - 60°C ein Mittelwert von 10,52 mU/ml.
Im H- Test nach Kruskal und Wallis ($H = 102{,}001$, $\alpha = 0{,}0$) haben sich diese geringen Abweichungen nicht als signifikant erwiesen.(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$). (26)
Siehe Tabelle I.

2. Glutamat - Oxalacetat - Transaminase.

Die Mittelwerte für die Glutamat - Oxalacetat - Transaminase in mU/ml sowie die Streuungen der Einzelwerte sind unter den verschiedenen Aufbewahrungsbedingungen in Tabelle II zusammengafaßt. Der Mittelwert beträgt bei der Sofortbestimmung 10,22 mU/ml. Der Vergleich nach 3-tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur ergibt einen Mittelwert von 9,45 mU/ml.

Nach 3-tägigem Stehen im Kühlschrank einen Mittelwert von 11,48 mU/ml, nach 7-tägigem Stehen im Kühlschrank einen Mittelwert von 11,25 mU/ml, nach 4 Wochen bei - 20°C einen Mittelwert von 9,81 mU/ml, nach 4 Wochen bei - 60°C einen Mittelwert von 9,89 mU/ml.

Die Mittelwerte unter den verschiedenen ufbewahrungsbedingungen zeigten auch hier im Vergleich zum Ausgangswert keine signifikanten Abweichungen, wie das Ergebnis des H- Tests nach Kruskal und Wallis erkennen läßt. (26)
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$).
Siehe Tabelle II.

3. Lactat - Dehydrogenase

Eine Übersicht über die Mittelwerte der Lactat - Dehydrogenase in mU/ml sowie die Streuungen der Einzelwerte unter verschiedenen Lagerungsbedingungen gibt Tabelle III.
Der Ausgangsmittelwert beträgt bei der Sofortbestimmung 119,50 mU/ml, nach Lagerung bei 3 Tage Zimmertemperatur beträgt der Mittelwert 119,50 mU/ml.
Nach 3 Tagen im Kühlschrank 121,03 mU/ml
nach 7 Tagen im Kühlschrank 117,44 mU/ml
nach 4 Wochen bei - 20°C 125,28 mU/ml
nach 4 Wochen bei - 60°C 128,91 mU/ml
Die Abweichung der verschieden gelagerten Proben ergab im Vergleich mit den sofort bestimmten Proben im H- Test nach Kruskal und Wallis keine Signifikanz.
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$).
Siehe Tabelle III

4. Glutamat - Dehydrogenase

Die Mittelwerte der Glutamat - Dehydrogenase in mU/ml und die Einzelwertstreuungen unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen zeigt die Tabelle IV.
Bei der Sofortbestimmung lag der Mittelwert bei 2,81 mU/ml.

Nach 3 Tagen Zimmertemperatur wurden 1,97 mU/ml
nach 3 Tagen Kühlschrank wurden 2,75 mU/ml
nach 7 Tagen Kühlschrank wurden 2,77 mU/ml
nach 4 Wochen bei - 20°C wurden 2,45 mU/ml
nach 4 Wochen bei - 60°C wurden 2,80 mU/ml
gemessen.
Die Auswertung nach Kruskal und Wallis läßt keine Signifikanzabweichungen erkennen. (26)
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$)
Siehe Tabelle IV.

5. Triglyceride

Tabelle V zeigt die Mittelwerte der Triglyceride in mg/100 ml und die Streuungen der Einzelwerte nach 3-tägigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur, nach 3-tägigem und 7-tägigem Stehen im Kühlschrank sowie nach 4- wöchigem Einfrieren bei - 20°C und - 60°C. Bei der Sofortbestimmung lag ein Ausgangswert von 132,05 mg/100 ml vor.
Nach 3 Tagen Zimmertemperatur wurden 107,59 mg/100 ml
nach 3 Tagen Kühlschrank wurden 124,34 mg/100 ml
nach 7 Tagen Kühlschrank wurden 128,94 mg/100 ml
nach 4 Wochen bei - 20°C wurden 146,35 mg/100 ml
nach 4 Wochen bei - 60°C wurden 155,49 mg/100 ml
gemessen.
Auch die Triglyceride ließen im H- Test nach Kruskal und Wallis keine Signifikanz erkennen. (26)
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$).
Siehe Tabelle V.

6. Freies Glycerin

Einen Überblick über die Mittelwerte des freien Glycerins und die Streuung der Einzelwerte unter diversen Bedingungen der Aufbewahrung ermittelt Tabelle VI.
Der Ausgangswert lag bei 0,93 mg/100 ml.

Nach 3- tägigem Stehen bei Zimmertemperatur erhielten wir einen Mittelwert von 3,33 mg/100 ml.
Nach 3-täg. Aufbewahrung im Kühlschrank einen Mittelwert von 1.10 mg/1oo ml, nach 7-tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank einen Mittelwert von 1,23 mg/100 ml, nach 4-wöchigem Einfrieren bei - 20°C einen Mittelwert von 0,93 mg/100 ml, nach 4- wöchigem Einfrieren bei - 60°C einen Mittelwert von 0,90 mg/100 ml.
Es zeigten sich bei einem Ausgangswert von 0,93 mg/100 ml eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes des 3 Tage bei Zimmertemperatur gelagerten Plasmas auf 3,33 mg/100 ml. Ebenfalls war eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes auf 1,23 mg/100 ml des 7 Tage im Kühlschrank bei + 4°C ausbewahrten Plasmas festzustellen. Dagegen ergaben die 3 Tage im Kühlschrank bei + 4°C gelagerten Proben mit 1,10 mg/100 ml sowie die bei - 20°C und - 60°C eingefrorenen Proben mit 0,93 mg/100 ml bzw. mit 0,90 mg/100 ml keine signifikanten Abweichungen auf Grund der statistischen Berechnung nach dem H- Test nach Kruskal und Wallis. (26)
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$).
Siehe Tabelle VI.

Tabelle I Glutamat - Pyruvat - Transaminase

	Sofort	3 Tage Zimm.Temp.	3 Tage Kühlschr.	7 Tage Kühlschr.	4 Wochen -20°C	4 Wochen - 60°C
Mittelwert GPT mU/ml	9,89	10,13	11,59	11,38	9,06	10,52
Streuung der Einzelwerte	± 8,466	± 8,010	± 7,947	± 8,186	± 8,806	8,304
t		0,114	0,830	0,713	0,383	0,298
α		91,0	41,0	47,9	70,3	76,7
Signifikanz		--	--	--	--	--

Tabelle I zeigt die Mittelwerte der Glutamat- Pyruvat - Transaminase unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Standardabweichung sowie die Signifikanzberechnung nach Kruskal und Wallis.
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$) (n = 32)

Tabelle II Glutamat - Oxalacetat - Transaminase

	Sofort	3 Tage Zi.Temp.	3 Tage Kühlschr.	7 Tage Kühlschr.	4 Wochen - 20°C	4 Wochen - 60°C
Mittelwert GOT mU/ml	10,22	9,45	11,48	11,25	9,81	9,89
Streuung der Einzelwerte	± 8,308	± 6,497	± 8,387	± 8,385	± 7,960	± 8,056
t		0,411	0,606	0,494	0,200	0,160
α		68,3	54,6	62,3	84,2	87,3
Signifikanz		--	--	--	--	--

Tabelle II zeigt die Mittelwerte der Glutamat - Oxalacetat - Transaminase unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Standardabweichung sowie die Signifikanzberechnung nach Kruskal und Wallis.
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq$ 5) (n = 32)

Tabelle III Lactat - Dehydrogenase

	Sofort	3 Tage Zi.Temp.	3 Tage Kühlschr.	7 Tage Kühlschr.	4 Wochen bei - 20°C	4 Wochen bei - 60°C
Mittelwert LDH mU/ml	119,50	119,50	121,03	117,44	125,28	128,91
Streuung der Einzelwerte	± 27,880	± 31,263	± 27,067	± 33,600	± 23,270	± 25,816
t		0,000	0,223	0,267	0,901	1.400
α		100,0	82,4	79,0	37,1	16,6
Signifikanz		--	--	--	--	--

Tabelle III zeigt die Mittelwerte der Lactat - Dehydrogenase unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Standardabweichung sowie die Signifikanzberechnung nach Kruskal und Wallis.

(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$). (n = 32)

Tabelle IV Glutamat - Dehydrogenase

	Sofort	3 Tage Zi.Temp.	3 Tage Kühlschr.	7 Tage Kühlschr.	4 Wochen -20°C	4 Wochen - 60°C
Mittelwert GLDH mU/ml	2,81	1,97	2,75	2,77	2,45	2,80
Streuung der Einzelwerte	±3,620	±2,687	±2,643	±3,509	±3,331	±3,225
t		1,047	0,075	0,046	0,417	0,015
α		29,9	94,1	96,4	67,8	98,8
Signifikanz		--	--	--	--	--

Tabelle IV zeigt die Mittelwerte der Glutamat - Dehydrogenase unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Standardabweichung sowie die Signifikanzberechnung nach Kruskal und Wallis.
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$). (n = 32)

Tabelle V Triglyceride

	Sofort	3 Tage Zi.Temp.	3 Tage Kühlschr.	7 Tage Kühlschr.	4 Wochen - 20°C	4 Wochen - 60°C
Mittelwert Triglyceride mg/100 ml	132,05	107,59	124,34	128,94	146,35	155,49
Streuung der Einzelwerte	± 72,873	± 73,782	± 84,261	± 68,856	± 73,682	± 96,584
t		1,281	0,367	0,170	0,755	1,025
α		20,5	71,5	86,5	45,3	31,0
Signifikanz		--	--	--	--	--

Tabelle V zeigt die Mittelwerte der Triglyceride in mg/100 ml unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Standardabweichung sowie die Signifikanzberechnung nach Kruskal und Wallis.
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$), (n = 32)

Tabelle VI Freies Glycerin

	Sofort	3 Tage Zi.Temp.	3 Tage Kühlschr.	7 Tage Kühlschr.	4 Wochen - 20°C	4 Wochen - 60°C
Mittelwert fr.Gleycerin mg/100 ml	0,93	3,33	1,10	1,23	0,93	0,90
Streuung der Einzelwerte	± 0,341	± 1,862	± 0,515	± 0,354	± 0,299	± 0,266
t		7,156	1,511	3,373	0,066	0,471
α		0,0	13,6	0,1	94,8	64,0
Signifikanz		+	--	+	--	--

Tabelle VI zeigt die Mittelwerte des freien Glycerins in mg/100 ml unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Standardabweichung sowie die Signifikanzberechnung nach Kruskal und Wallis.
(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$). (n = 32)

Tabelle VII

	Mittelwerte des freien Glycerins in mg/100 ml	Streuung der Einzelwerte
Sofort	0,44	± 0,125
1/2 Std.	0,52	± 0,128
2 "	0,61	± 0,135
5 "	0,74	± 0,130
8 "	0,96	± 0,178
16 "	1,16	± 0,300
24 "	1,70	± 0,758
32 "	2,51	± 1,012
48 "	3,15	± 0,859
60 "	4,16	± 1,475
72 "	4,74	± 1,653
84 "	5,30	± 1,813
96 "	5,88	± 1.947

Tabelle VII zeigt die Mittelwerte des freien Glycerins und die Streuung der Einzelwerte sowie die Signifikanzberechnung nach dem Friedman - Test für die verschiedenen Lagerungszeiten bei Zimmertemperatur.

$\alpha = 3 \times 10^{-5}$

(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$) (n = 10)

D. Diskussion

In der Literatur sind uns einige zum Teil sich widersprechende Untersuchungsergebnisse über die Haltbarkeit von Fermentproteinen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen bekannt.
Über die Stabilität der von uns untersuchten Blutlipide unter verschiedenen Aufbewahrungsbedingungen fanden wir in dem einschlägigen Schrifttum kaum Hinweise.
E.F.W. Schmidt(43) untersuchten im Serum die 4 für die Leberdiagnostik wesentlichen Enzyme GOT, GPT, GLDH und LDH. Die einzelnen Proben wurden bei + 4°C aufbewahrt und nach 1,2,3,7-8 und 12 - 14 Tagen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die Aktivitätsabnahme bis zum 4. Tag nach der Blutentnahme im Durchschnitt bei 10% lag. In Einzelfällen überstieg sie 20%, oder aber der Aktivitätsverlust war nur sehr geringfügig. Auch 2 Wochen nach der Entnahme waren im Durchschnitt noch mindestens 70% der Anfangsaktivität vorhanden. Dabei erwies sich die GOT mit rund 83% der zu Anfang gemessenen Aktivität mit am stabilsten. H. Südhof u. W. Wötzel (47) berichteten über eine außerordentlich rasche Inaktivierung von Serumenzymaktivitäten. Einige Proben wurden nach der Blutentnahme bei Zimmertemperatur belassen, 4 Proben im Kühlschrank und 2 Proben in der Tiefkühltruhe bei - 20°C aufgehoben. Die Messung der bei Zimmertemperatur und bei +4°C aufbewahrten Proben erfolgten nach 6,12,24 und 48 Stunden, die in der Kühltruhe gelagerten Proben nach 12 und 48 Stunden. Alle bei Zimmertemperatur aufbewahrten Proben erfuhren einen merklichen bis erheblichen Aktivitätsverlust und zwar:

nach	6	Std.	GPT	10%,	GOT	6%	und LDH	10%
"	12	"	"	13%,	"	18%	" "	22%
"	14	"	"	14%,	"	22%	" "	23%
"	48	"	"	20%,	"	30%	" "	35%

Die Aktivitätsabnahme ging bei der Aufbewahrung bei + 4°C etwas langsamer vonstatten und zwar betrug sie:

nach	6	Std.	GPT	3%,	GOT	8%	und LDH	9%
"	12	"	"	6%,	"	15%	" "	17%
"	24	"	"	12%,	"	17%	" "	27%
"	48	"	"	20%,	"	25%	" "	37%

Nach 12- stündiger Lagerung bei - 20°C in der Kühltruhe wurden folgende Aktivitätsverluste gemessen:
GPT 8%, GOT 3%, LDH 16% und nach 48- stündiger Lagerung:
GPT 14%,GOT 8%, LDH 27%.
Die Autoren schlossen aus ihren Beobachtungen, daß Lagerung und möglicher Versand von Serumproben nur mit Vorbehalt möglich sind.
S. Feissli, G. Forster, G. Laudahn, E.u. F.W. Schmidt (17) beobachteten bei ihren Untersuchungen über Enzymaktivitätsveränderungen im Serum in vitro nur ein langsames Absinken der Fermentaktivität. Nach ihren Messungen zeigten besonders die Aktivitäten der GOT und LDH eine bemerkenswerte Stabilität, auch bei + 25°C. Einen geringen, aber zu berücksichtigenden Aktivitätsverlust erlitten GPT und GLDH.
Bei der Aufbewahrung der Seren im Kühlschrank betrug die Abnahme der Aktivitäten bis zum 3. Tag im Durchschnitt etwa 10%, bei Lagerung bei Zimmertemperatur (+ 25°C) etwa 20% der Ausgangsaktivitäten. Manche Enzyme ließen im Beginn der Alterung einen geringen Aktivitätsanstieg erkennen.

R. Richterich, F. Verry u. K. Stampfli (33) registrierten bei Zimmertemperatur (21°C) aufbewahrten und nach 3, 9, 24, 48 Stunden und nach 1 Woche gemessenen Serumproben einen raschen Abfall der Enzymaktivität. Bei +4°C war dieser deutlich geringer und in gefrorenem Zustand sehr gering.

O. Bodansky et al. (5) fanden eine gute Haltbarkeit der Transaminasenaktivität bei Zimmertemperatur, außerdem wiesen sie in ihren Versuchen nach, daß die Glutamat - Oxalacetat - Transaminase mit normaler Aktivität bei - 10°C bis - 20°C für mindestens 10 Monate ohne nennenswerten Aktivitätsverlust gelagert werden kann. Seren mit hohen GOT- Aktivitäten können zirka 4 Monate aufbewahrt werden. K. Vetter, H. Griesche und K. Moch (48) entdeckten bei ihren Aktivitätsmessungen der GOT, GPT und LDH innerhalb von 4 Stunden nach der Blutentnahme keinerlei Aktivitätsverluste. R.P. Mac Donald, J.R. Simpson und E.Nossal (11) zogen aus ihren Untersuchungen über die Serum- Lactat - Dehydrogenase den Schluß, daß das zur Aktivitätsmessung benötigte Serum bei + 4°C 5 Tage lang und in der Tiefkühltruhe 10 Tage lang aufbewahrt werden kann. H.H. Kreutzer, W.H.S. Fennis (25) beobachteten, daß die LDH-Aktivität auch bei gekühlter Lagerung innerhalb weniger Tage deutlich abnahm.

Kunitake et al. (27) fanden bei gefroren aufbewahrten Proben, die in wöchentlichen Intervallen auf LDH- Aktivitätsänderungen untersucht wurden, auch nach 4 Wochen keinen bemerkenswerten Aktivitätsverlust. In diesem Zusammenhang wird Miyada (Liyada, D.S.Personal communication) zitiert, der selbst bei der Bestimmung von 2 1/2 Jahren gefroren gelagerten Seren keinerlei Aktivitätsabnahme der LDH feststellen konnte. R.F. Erickson und D.R. Molares (16) bemerkten bei ihren Messungen bei +4°C gelagerten Seren keinen signifikanten Abfall in der LDH- Aktivität innerhalb 1 Woche. Bei eingefrorenen Proben ließ sich die Stabilität bis zu 1 Monat nachweisen.

E.u. F.W. Schmidt (42) stellten vergleichende Untersuchungen über die Alterung der GLDH im Serum in der Zeit bei +3°C an und fanden folgende Aktivitätsabnahme:

1 Tg. alt	2 Tg. alt	3 Tg. alt	4 Tg.alt	8 Tg. alt	12 Tg.alt
100	95	87	86	74	70
± 5	± 5	± 8	± 11	± 23	± 21

D. Amelung, L. Hofmann u. L. Otto (4) lieferten bei ihren Untersuchungen zur Haltbarkeit der Fermentaktivität im Serum folgende Ergebnisse:
"Relativ gering war die Aktivitätsabnahme der GOT, insbesondere bei Aufbewahrung in der Kühltruhe. Deutlich instabiler war die GPT. Bei Zimmertemperatur war nach 24 Stunden die Aktivität um 11%, nach 48 Stunden um etwa 22% abgefallen. In der Kälte betrug der Aktivitätsverlust 5 - 10%. Auffällig war die starke Abnahme der LDH- Aktivität in der Kühltruhe. Im Gegensatz zu den bei Zimmertemperatur bzw. im Kühlschrank aufbewahrten Proben, deren Aktivität sich nach 6 Stunden nicht geändert hatte, zeigten die eingefrorenen Seren bereits nach wenigen Stunden einen merklichen Abfall der LDH- Aktivität, nach 2 Tagen betrug der Aktivitätsverlust im Mittel 42%. Aber auch bei Zimmertemperatur und im Kühlschrank war die LDH insgesamt instabiler als die Transaminasen, relativ gering war der Aktivitätsverlust der LDH bei Zimmertemperatur."
S. Massarat (28) fand nach 48 Stunden für die GOT einen Aktivitätsverlust von 7% ± 11,3 bei 24°C und von 5,6% ± 7,7 bei + 4°C.
Die entsprechenden Werte für die GPT betrugen 21,6% ± 7,3 bei 24°C und 6,7% ± 2,0 bei + 4°C.
J. King (23) bewahrte Serum 3 Wochen lang bei + 4°C auf und fand keine oder nur sehr geringe Abnahme der LDH- Enzymaktivität. F. Wroblewski und J.S. La Due (50) lagerten Serum 96 Stunden lang bei Zimmertemperatur und beobachteten während dieser Zeit keinerlei Aktivitätsverlust der LDH.

O. Mühlfellner ('29) führte Triglyceridbestimmungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen nach der Methode von van Handel und Zilversmit durch. Die bei 3 Tage Zimmertemperatur, 3 Tage und 1 Woche Kühlschrank, sowie in der Tiefkühltruhe aufbewahrten Fraktionen ließen keine Signifikanz erkennen.
Entsprechende Untersuchungen des freien Glycerins unter verschiedenen Lagerungsbedingungen konnten wir in der Literatur nicht entdecken.

Bei unseren vergleichenden Untersuchungen, bei denen Plasma von 32 Probanden verarbeitet wurde, fanden wir für die Enzyme GPT, GOT, LDH und GLDH sowie für die Triglyceride bei Lagerung über 3 Tage bei Zimmertemperatur (25°C), über 3 und 7 Tage im Kühlschrank bei 4°C und über 4 Wochen bei - 20°C und - 80°C keine signifikanten Änderungen. Lediglich die Fraktion des freien Glycerins ließ nach 3-tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur eine signifikante Erhöhung und zwar um 25% des Ausgangswertes erkennen. Desgleichen war bei 7-tägiger Lagerung im Kühlschrank ein signifikanter Anstieg und zwar um 32% des Ausgangswertes zu verzeichnen. Die 3 Tage bei +4°C und 4 Wochen bei - 20°C und bei - 80°C aufbewahrten Proben ergaben dagegen keine Signifikanz.

Um den signifikanten Anstieg des freien Glycerins genauer verfolgen zu können, führten wir eine weitere Untersuchungsreihe durch. Von 10 weiteren Probanden wurden Plasmaproben gewonnen und in je 15 Portionen aufgeteilt, von denen die erste sofort, die zweite nach 1/2 Stunde, die dritte nach 2 Stunden, die vierte nach 5 Stunden, die fünfte nach 8 Stunden, die sechste nach 16 Stunden, die siebte nach 24 Stunden, die achte nach 32 Stunden, die neunte nach 48 Stunden und die zehnte bis dreizehnte in 12- stündigen Abständen nach Aufbewahrung bei Zimmertemperatur bestimmt wurden.

Von einem Ausgangsmittelwert von 0,44 mg/100 ml ausgehend, registrierten wir einen kontinuierlichen Anstieg bis auf 5,88 mg/100 ml nach 96 Stunden. Dieser Anstieg war nach dem Friedman - Test hochsignifikant.

siehe Tabelle VII

Mühlfellner (29) fand bei Untersuchungen der freien Fettsäuren ähnliche Ergebnisse.

Aus den von uns durchgeführten Untersuchungen über die Stabilität von 4 Fermentproteinen und zweier Lipidfraktionen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen erwachsen uns Richtlinien zur Verschickung und zweckmäßigen Aufbewahrung von Plasma.
Sollen Fermentaktivitätsbestimmungen der GPT, GOT, LDH und der GLDH vorgenommen werden, so ist es ohne weiteres möglich, bis zur Verschickung an ein größeres, klinisch- chemisches Labor mehrere Plasmaproben zu sammeln und diese für einige Tage im Kühlschrank zu lagern oder dieselben mindestens 4 Wochen lang gefroren in der Tiefkühltruhe bei - 20°C bzw. - 60°C aufzubewahren. Auf dem Transportweg ist es nicht unbedingt erforderlich, die Proben zu kühlen, da auch bei Zimmertemperatur keine signifikante Änderung der Enzymaktivitäten eintritt.
Wird die enzymatische Bestimmung der Triglyceride gewünscht, so ist es ebenso unerheblich, ob die Proben gleich nach der Blutentnahme aufgearbeitet werden oder aber bis zur Versendung kurze Zeit bei Zimmertemperatur, im Kühlschrank und gar 4 Wochen in der Tiefkühltruhe gelagert werden.
Bei der Bestimmung des freien Glycerins genügt es bei sofortiger Verschickung nach der Blutentnahme die betreffenden Proben gekühlt bei + 4°C zu transportieren. Werden wegen der Aufwendigkeit der Bestimmung von Lipidfraktionen bis zum Versand mehrere Proben gesammelt, so sollten diese bis zum vorgesehenen Termin eingefroren werden, auf keinen Fall aber bei Zimmertemperatur oder für längere Zeit im

Kühlschrank gelagert werden, da dies zu stark erhöhten Meßergebnissen führt.
Um für wissenschaftliche Untersuchungen geringste Ungenauigkeiten auszuschalten, ist es ratsam, die enzymatische Bestimmung des freien Glycerins möglichst sofort nach der Blutabnahme durchzuführen. Schon 1/2 Stunde nach der Plasmagewinnung setzt bei Zimmertemperatur ein Anstieg ein. Sollte die Probenverarbeitung nicht gleich durchführbar sein, dann ist es ratsam, das betreffende Untersuchungsmaterial gleich nach der Blutentnahme bei - 20°C oder - 60°C in der Tiefkühltruhe einzulagern.

E. Zusammenfassung

Im Plasma von 32 Probanden wurden möglicherweise auftretende Änderungen von Enzymaktivitäten und Lipidfraktionen unter 3-tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur, unter 3- bzw. 7-tägiger Lagerung im Kühlschrank bei + 4°C und unter Einfrieren in der Tiefkühltruhe bei - 20°C und - 60°C untersucht.
Die Aktivitäten der Glutamat- Pyruvat- Transaminase, der Glutamat - Oxalacetat - Transaminase, der Lactat - Dehydrogenase, und der Glutamat - Dehydrogenase ließen unter den verschiedenen Lagerungszeiten und Bedingungen keine signifikanten Änderungen erkennen. Auch die Messungen bei den Triglyceriden ließen eine Signifikanz vermissen. Dagegen stiegen die Werte des freien Glycerins bei 3-tägigem Stehen bei Zimmertemperatur um 258% des Ausgangswertes und bei 7-tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank bei +4°C erhöhten sich die Werte um 32% des Anfangswertes.
Die erarbeiteten Ergebnisse werden mit den in der Literatur angegebenen verglichen und Folgerungen für die Verschickung und Aufbewahrung von Plasmaproben zum Zweck der Enzymaktivitätsbestimmungen und Blutfettuntersuchungen gezogen.

Literatur

1) Albrink, M.J. and [illegible] — Serum triglycerides in health and diabetes. Diabetes 7, 194 (1958)

2) Albrink, M.J. — Triglycerides, Lipoproteins and Coronary Disease. Arch.Int.Med. 109, 545 (1962)

3) Albrink, [illegible] — Lactescense of serum following episodes of acute alkoholism and its probale relationship to acute pancreatitis. Am.J.Med. 23, 26 (1957)

4) Amelung, D., L.Hofmann und L. Otto — Untersuchungen zur Haltbarkeit der Fermentaktivität im Serum. Dtsch.Med.Wschr. 91, 851 (1966)

5) Bodansky, O. et al. — Infectionshepatitis. Correlation of clinical and laboratory findings, including serum encyme changes. Am.J.Dis.Child. 98, 160 (1959)

6) Braunsteiner, H., S.Sailer und F. Sandhofer — Plasmalipide bei Patienten mit Diabetes mellitus. Klin. Wschr. 44, 116 (1966)

7) Braunsteiner, H. et al. — Lipidwerte bei gesunden Personen und Patienten mit Myocardinfarkt. Wien,klin.Wschr. 77, 959 (1965)

8) Crutzfeld, W.H.Schmidt J. Riechert, K. Kaiser und M. Matthes
Hepatitisübertragungen über eine Zeitspanne von 10 Jahren durch einen Blutspender mit posthepatischer Lebercirrhose
Dr. Med. Wschr. 87, 1801 (1962)

9) Dewar, H.A., N.R. Rowell and A.J. Smith
Serumglutamic oxalacetic transaminase in acute myocardial infarction
Brit. Med. J. 1958, II,1121

10) Gable, A.J. and E.M. O'Brien
Acute myocardial ischämia. Significance of plasma transaminase activity
Lancet 1958, II, 873

11) Mc Donald, R.P.,J.R. Simpson and E.Nossal
Serum lactic dehydrogenase - a diagnostic aid in myocardial infarction
M.Am.med.Ass. 165, 35 (1957)

12) Eggstein, M.
Diabetes und Fett
Med. Welt, 18, 843, (1967)

13) Eggstein, M.
Carbohydrates and lipid Metabolism. Patho-Physiol. und klin. Aspekte des Fettstoffwechsels
Herausg. Schettler, G. und R.C. Sanwald
Thieme- Verlag Stuttgart, 1966, S. 65

14) Eggstein, M. und F.H.Kreutz
Enzymatische Bestimmungen der Neutralfette im Blutserum
Ergeb. Laborat. Med. 2, 99 (1965)

15) Eggstein, M. und F.H.Kreutz
Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe
Klin. Wschr. 44, 262 (1966)

16) Erickson, R.F. and D.R. Morales
Medical progress
Clin. use of lactic dehydrogenase
New Engl.J.Med. 265, 478 (1961)

17) Feissli, S. et al.
Normalwerte und Alterung von Hauptkettenenzymen im Serum
Klin. Wschr. 44, 390-396 (1966)

18) Filippa, G.
Die diagnostische Bedeutung der GLDH - Aktivität im Serum
Enzymol.biol.klin. 3, 97- 128 (1963)

19) Heyck, K. und G. Laudan
Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien
Klin. Wschr. 41, 905 (1963)

20) Kaffarnik, H.
Klin. und biochem. Untersuchungen von essentiellen symptomatischen und induzierten Vermehrung der Serumlipide
Habilitationsschrift 1968 Marburg/Lahn

21) Kahlke, W.
Differenzierung der essentiellen familiären Hyperlipoproteinaemien (Hyperlipidaemien)
Dt.Med.Wschr. 91, 26 (1966)

22) Karmen, A., F. Wroblewski and J.S. Da Lue
Transaminase Activity in Human Blood
J. klin.invest. 34, 126 and 131 - 133 (1955)

23) King, J.
Routine method for estimation of lactic dehydrogenase activity
J.m.lab. Technology 16, 265 (1959)

24) Kreutz, F.H.
Enzymatische Bestimmung von Glycerin zur Messung von Triglyceriden
Med.Klin. 59, 280 (1964)

25) Kreutzer, H.H., W.H.S. Fennis
Lactic dehydrogenase - iso - enzyme in blood serum after storage at different temperatures
Clin,chem. acta 9, 64 (1964)

26) Kreyszig, E.
Statistische Methoden und ihre Anwendungen
Vandenhoek und Ruprecht, Göttingen 1965

27) Kunitake, G.M. et al.
Stability of serum lactic dehydrogenase
Lancet 1964 / I, 1105

28) Massarat, S.
Studium über die in vitro-Alterung der Transaminasen im Serum und im Gewebsextrakt
Enzym. biol.clin. 5, 200 - 208, 1965

29) Mühlfellner, O.
Über die Haltbarkeit der Plasmalipide unter verschiedenen Lagerungsbedingungen
Inaugural-Dissertation, Marburg/Lahn, 1969

30) Pezold, F.
In: Lipide und Lipoproteide im Blutplasma
Springer- Verlag, Berlin - Göttingen, Heidelberg 1961

31) Ratschow, M. — Angiologie
Gg. Thieme- Verlag,
Stuttgart 1959

32) Rautenberg, W. — Über die Häufigkeit der Coronarsklerose und des Myocardinfarktes in der Nachkriegszeit
Dt. Gesundheitswesen 12, 325, 1958

33) Richterich, R., F. Verry und K. Stampfli — Serumenzyme bei Blutspendern II. Hepatitis Screening durch Bestimmung der Serum-Glutamat - Pyruvat- Transaminase
Schweiz. Med. Wschr. 91, 1430, 1961

34) Schettler, G. — Arteriosklerose
Gg. Thieme- Verlag,
Stuttgart 1961, S. 306

35) Schettler, G. — Lipids and Lipidosis
Springer - Verlag,
Berlin- Heidelberg, New York

36) Schettler, G. — Neuere Ergebnisse klin. Fettstoffwechselstudien
Medizin und Ernährung
6, 201, 1965

37) Schettler, G. — Klin. Lipidstoffwechselstörungen. In: 16. Kolloqium der Ges.f. Phys. Chemie
Mosbach, 1965, Springer-Verlag

38) Schmidt, E. und F.W. — Enzymbestimmungen im Serum bei Lebererkrankungen (Funktions- Muster als Hilfsmittel der Diagnose)
Enzymol.biol.clin. 3, 1, 1963

39) Schmidt, E. und F.W. — Das Verteilungsmuster einiger Enzyme in der menschl.Leber und seine Veränderungen unter Zellschädigung
Enzymol. clin. 3, 37 - 79, 196

40) Schmidt, E. und F.W. — Enzymmuster menschl. Gewebe
Klin. Wschr. 38, 957, 1960

41) Schmidt, E., und F.W. und E. Wildhirt — Fermentaktivitätsbestimmungen in der menschlichen Leber
Klin. Wschr. 37, 1221
1959

42) Schmidt, E. und F.W. — Methode und Wert der Bestimmung der Glutaminsäure Dehydrogenase im Serum
Klin. Wschr. 40, 962,
1962

43) Schmidt, E. und F.W. — Untersuchungen über die Alterung von Enzymen in vitro
Enzymol. biol.clin. 3, 80 - 86, 1963

44) Schmidt, F.H. und K.v. Dahl — Zur Methode der enzymatischen Neutralfettbestimmung in biolog. Material
Z.klin.chem. u. klin.biochem. 6, 156, 1968

45) Schmidt, F.W. — Enzymbestimmungen zur Diagnose und Verlaufsbeobachtung von Lebererkrankungen
Verh. Dtsch.Ges. inn. Med. 1964, S 612

46) Solbach, H.G., A. Engelhardt und R.Merten — Unterschied der Enzymaktivitäten im Serum und Plasma und ihre Bedeutung für die klin. Enzymdiagnostik
Klin. Wschr. 40, 1136,
1962

47) Südhof, H. und E. Wötzel — Über die Haltbarkeit von zur Enzymaktivitätsbestimmung vorgesehenen Serumproben
Klin. Wschr. 38, 1165,
1960

48) Vetter, K.H. Grieche und K. Moch — Serumfermente und ihr Verhalten. Zeitschr. Inn. Med. 16, 359, 1961

49) Wroblewski, F. und J.S. La Due — Serum glutamic pyruvic transaminase in Cardiac and hypatic disease Proc. Soc.exp. biol. med. 91, 569, 1956

50) Wroblewski, F. und J.S.La Due — Lactat - Dehydrogenase activity in blood Proc. Soc. exp.biol.med. 90, 210 - 213, 1955

Lebenslauf

Als Sohn des Bankangestellten Gustav Weber und seiner Ehefrau Maria Weber, geb. Holzmann, beide wohnhaft Edenkoben /Pfalz, wurde ich, Edwin, Hermann Weber, am 22.Februar 1940 in Edenkoben, Kr Landau/ Rheinland - Pfalz geboren.
Ab meinem 7. Lebensjahr besuchte ich 4 Jahre die Volksschule in Edenkoben und anschließend für weitere 6 Jahre das Progymnasium am gleichen Ort. Die 3- jährige Oberstufe bis zum Abitur absolvierte ich am Städt. Neusprachlichen Gymnasium in Landau/Pfalz, wo ich am 4. März 1960 die Reifeprüfung bestand.
Im Sommersemester 1960 nahm ich an der Johann- Wolfgang- Goethe- Universität in Frankfurt/Main das Studium der Neuphilologie auf.
Im Jahre 1961 beantragte ich die Übernahme in die Medizinische Fakultät und begann anschließend mit dem Studium der Zahnheilkunde.
Kurz vor der Ablegung der zahnärztlichen Vorprüfung erkrankte ich und mußte für längere Zeit beurlaubt werden.
Im Wintersemester 1966/67 nahm ich dann das Studium der Zahnheilkunde an der Philipps- Universität in Marburg an der Lahn wieder auf und bestand am 21.3.1967 das Physikum.
Die für das Studium vorgeschriebenen 5 klinischen Semester absolvierte ich dann ebenfalls an der Philipps- Universität in Marburg/Lahn.
Im Mai 1969 reichte ich die Meldung zur Staatsprüfung ein und beendete im November 1969 vor dem Prüfungsausschuß für die zahnärztliche Prüfung mein Studium mit dem Staatsexamen.
Von Januar bis August 1970 arbeitete ich an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg an meiner Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades.

Herrn Prof. Dr. D. Klaus gilt mein Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg an der Lahn.

Herrn Prof. Dr. H. Kaffarnik bin ich zu großem Dank für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hinweise und Anregungen verpflichtet.

Desgleichen danke ich Herrn Dipl. Mathematiker P. Zöfel von der zentralen Rechenanlage der Universität Marburg für die statistische Bearbeitung der Ergebnisse.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Frankfurt/Main:

Czerny, Frick, Giersberg, Greven, Heinz, Kretschmann, Kuck, Lotz, Martinen, Müser, Ried, Rocka, Royen, Schneider, Seubert, Starck, Wetzlar, Wieland, Zahn.

in Marburg/Lahn:

Bommer, Cleve, Dimroth, Gedigk, Hennis, Hering, Heuser, Janke, Karlson. Koransky, Korb, Kreuz, Lang, Mann, Niemeyer, Pantke, Petry, Pfütz, Rodeck, Rohen, Rosemann, Salfeld, Schiff, Schmidt, Schmitz- Moormann, Seidel, Siegert, Siess, Staib, Strohmeyer, Voss, Walcher.